

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-140677

(43)Date of publication of application : 04.06.1996

---

(51)Int.Cl. C12N 15/09  
C07H 21/04  
C07K 19/00  
C12P 21/02  
// A61K 38/00  
(C12P 21/02  
C12R 1:91 )

---

(21)Application number : 06-008238

(71)Applicant : SCIENCE & TECH AGENCY

(22)Date of filing : 28.01.1994

(72)Inventor : SEKIGUCHI KIYOTOSHI  
AKAMATSU DAIKI  
MATSUYAMA SATOSHI  
ICHIHARA KEIKO

---

## (54) CHIMERA PROTEIN AND ITS PRODUCTION

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a chimera protein containing an amino acid chain of a foreign protein or peptide inserted into a specific site of a fibronectin molecule, capable of targeting an arbitrary functional protein to an extracellular matrix and useful e.g. for the research and development of pharmaceuticals.

**CONSTITUTION:** This chimera protein is produced by inserting an amino acid chain of a foreign protein or peptide between an N-terminal 70kDa region and a C-terminal 37kDa region of a fibronectin molecule. The protein is a specific inhibitor acting as a foreign protein or peptide on a matrix metalloproteinase which is a matrix decomposition enzyme of cancer cell. Functional proteins such as TIMP-1 effective for suppressing the infiltration and metastasis of cancer, protein A expected to be useful for the immunological suppression of cancer and a luminescent protein aequorin useful for the tracking of material metabolism in an extracellular matrix can be insolubilized or targeted in the extracellular matrix and the objective protein can be utilized as an agent for the research and development of a drug.

---

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-140677

(43) 公開日 平成8年(1996)6月4日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 0 7 H 21/04	B			
C 0 7 K 19/00		8318-4H		
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			A 6 1 K 37/ 02	A D U
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 7 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-8238

(22) 出願日 平成6年(1994)1月28日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年7月31日、  
癌と化学療法社発行の「B I O T H E R A P Y 第7巻第  
8号」に発表

(71) 出願人 592146265

科学技術庁長官官房会計課長  
東京都千代田区霞ヶ関二丁目2番1号

(72) 発明者 関口 清俊

大阪府堺市新槍尾台3-1-2-301

(72) 発明者 赤松 大樹

大阪府大阪市都島区友楽町1-5-8-  
1408

(72) 発明者 松山 聡

大阪府岸和田市葛城町95-2

(72) 発明者 市原 啓子

愛知県豊明市栄町上栞子6-65-306

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

(54) 【発明の名称】 キメラ蛋白質およびその製造法

(57) 【要約】

【目的】 任意の機能性蛋白質を細胞外マトリックスに  
ターゲティングできる技術の開発。

【構成】 フィブロネクチン分子のN末端70kDa領  
域とC末端37kDa領域との間に、異種の蛋白質また  
はペプチドのアミノ酸鎖を挿入してなるキメラ蛋白質。

【効果】 該キメラ蛋白質により、細胞外マトリックス  
へ所望の物質がターゲティングでき、医薬等の研究、開  
発に利用できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 フィブロネクチン分子のN末端70kDa領域とC末端37kDa領域との間に、異種の蛋白質またはペプチドのアミノ酸鎖を挿入してなるキメラ蛋白質。

【請求項2】 異種蛋白質またはペプチドがTIMP-1である請求項1記載のキメラ蛋白質。

【請求項3】 異種蛋白質またはペプチドがプロテインAのIgG結合ドメインである請求項1記載のキメラ蛋白質。

【請求項4】 異種蛋白質またはペプチドがエクオリンである請求項1記載のキメラ蛋白質。

【請求項5】 フィブロネクチン分子のN末端70kDa領域とC末端37kDa領域との間に、異種の蛋白質またはペプチドのアミノ酸鎖を挿入してなるキメラ蛋白質をコードするDNAで形質転換した宿主細胞を増殖させ、該キメラ蛋白質を細胞外マトリックスとして発現させることを特徴とするキメラ蛋白質の製造法。

【請求項6】 異種蛋白質またはペプチドがTIMP-1である請求項5記載の製造法。

【請求項7】 異種蛋白質またはペプチドがプロテインAのIgG結合ドメインである請求項5記載の製造法。

【請求項8】 異種蛋白質またはペプチドがエクオリンである請求項5記載の製造法。

【請求項9】 フィブロネクチン分子のN末端70kDa領域とC末端37kDa領域との間に、異種の蛋白質またはペプチドのアミノ酸鎖を挿入してなるキメラ蛋白質をコードするDNAで形質転換した宿主細胞を増殖させ、該キメラ蛋白質を細胞外マトリックス中に発現させることを特徴とする細胞外マトリックスに該蛋白質またはペプチドをターゲティングする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規な生理活性を有し、医薬等としての利用が期待されるキメラ蛋白質およびその製造法に関する。さらに詳しくは、本発明のキメラ蛋白質は、線維形成能を有する細胞外マトリックス蛋白質であるフィブロネクチンと、異種、特に、非マトリックス性の蛋白質またはペプチドのキメラ蛋白質で、該異種蛋白質またはペプチドの細胞外マトリックスへの組織化に有用である。

## 【0002】

【従来の技術】 細胞外マトリックスは、細胞の外周に形成される線維状構造体であり、その主要構成成分は、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、エラスチン、ラミニン、テネイシン等の種々の糖蛋白質である。従来、細胞外マトリックスは、細胞の間隙を埋める単なる充填物であるとか、細胞が接着するための単なる物理的な足場と考えられてきた。しかし、近年、細胞外マトリックスも、細胞の増殖、分化、移動のごとき基本

的な細胞の機能制御にかかわっていることが次第に明らかにされてきた（関口清俊編、実験医学、第11巻、第2号、特集「細胞外マトリックスの構築と機能発現」、羊土社、1993年2月）。また、細胞外マトリックスは、がん細胞の浸潤や転移、創傷治癒、炎症、血栓形成など、臨床的に重要な現象にも深くかかわっていることが報告されている。このような、細胞外マトリックスが示す様々な生理活性が具体的に細胞外マトリックスのどの構成成分と細胞表面のどのようなレセプター分子との相互作用によって制御されているかは、未だ不明な点が多いが、細胞外マトリックスの各構成成分が正しく線維状または網目状の三次元構造に組織化されることが、その機能発現に極めて重要であると考えられている。最近、かかる細胞外マトリックスに帰属する生理活性の重要性に鑑み、合成高分子を基本とした人工的な細胞外マトリックスを利用した細胞の機能抑制に関する研究が盛んになりつつあるが、天然の各構成成分が形成する線維構造の三次元ネットワークに基づく生理機能を模倣するレベルには未だ達していない。このような事情から、天然の細胞外マトリックスの構造と機能を基本的に継承した、細胞外マトリックスへ所望の物質をターゲティングする技術、さらには天然のマトリックスにはない新規生理活性を有する半天然型の細胞外マトリックスを創製する技術の開発が要求されている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、細胞外マトリックスの主要な構成成分であるフィブロネクチンが、細胞結合ドメインを含むその分子中央部を欠いても、マトリックスへ取り込まれることに着目し、フィブロネクチンの構造と機能に関して鋭意研究を続けた。その結果、フィブロネクチン分子上の該線維形成に必要な活性領域だけを遺伝子工学的に取り出し、他の蛋白質またはペプチド、特に、他の非マトリックス性の蛋白質またはペプチドとキメラ体を形成させることに成功し、任意の機能性蛋白質またはペプチドを細胞外マトリックスに不溶化またはターゲティングできることを見だし、本発明を完成するに至った。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、フィブロネクチン分子のN末端70kDa領域とC末端37kDa領域との間に、異種の蛋白質またはペプチドのアミノ酸鎖を挿入してなる新規なキメラ蛋白質を提供するものである。また、本発明は、フィブロネクチン分子のN末端70kDa領域とC末端37kDa領域との間に、異種の蛋白質またはペプチドのアミノ酸鎖を挿入してなるキメラ蛋白質をコードするDNAで形質転換した宿主細胞を増殖させ、該キメラ蛋白質を細胞外マトリックスとして発現させることを特徴とするキメラ蛋白質の製造法も提供する。

【0005】 さらに、本発明は、フィブロネクチン分子

のN末端70kDa領域とC末端37kDa領域との間に、異種の蛋白質またはペプチドのアミノ酸鎖を挿入してなるキメラ蛋白質をコードするDNAで形質転換した宿主細胞を増殖させ、該キメラ蛋白質を細胞外マトリックス中に発現させることを特徴とする細胞外マトリックスに該蛋白質またはペプチドを不溶化またはターゲティングする方法も提供するものである。以下、本発明を詳細に説明する。

【0006】フィブロネクチンは複数の機能ドメインからなる糖蛋白質で、間質マトリックスの主要構成成分であり、血漿などの体液中にも広く存在する物質である。添付の図1の模式的構造に示すごとく、フィブロネクチン分子は約250kDaの2つのサブユニットがC末端付近で2つのジスルフィド結合により架橋された二量体として細胞により合成、分泌される。各サブユニットはI型～III型の3種のモジュールの重複によって構成されている。本発明者らは、先に、フィブロネクチンのN末端70kDa領域とC末端37kDa領域かなる組換え蛋白質（ミニフィブロネクチン）が、細胞結合ドメインを含む大部分のIII型モジュールを欠いているにもかかわらず、細胞外マトリックスに効率よく取り込まれることを見いだした（J. Biol. Chem. 265: 401-407, 1990およびFEBS letters, 299: 155-158, 1992）。

【0007】本発明のキメラ蛋白質は、このミニフィブロネクチンのN末端領域とジスルフィド結合を含むC末端領域との間に、異種（外来）の蛋白質またはペプチドのアミノ酸鎖を挿入した構造を有する。異種の蛋白質またはペプチドとしては、特に、限定するものではなく、挿入可能なものはいずれでもよいが、非マトリックス性の、有用な生理活性や機能を有するものが好ましい。例えば、がん細胞のマトリックス分解酵素であるマトリックスメタプロイティナーゼ（MMP）に体する特異的インヒビターであり、がんの浸潤や転移の抑制に有効と考えられるTIMP、免疫学的ながん抑制に有用と考えられるプロテインA、細胞外マトリックスにおける物質代謝の追跡に有用と考えられる発光蛋白質であるエクオリン等が挙げられる。

【0008】本発明のキメラ蛋白質を得るには、例えば、公知の遺伝子工学技法に従って、まず、ミニフィブロネクチンのN末端領域とC末端領域をコードするcDNAの連結部にマルチクローニング部を導入し（図1のミニフィブロネクチン参照）、このマルチクローニング部に、異種蛋白質またはペプチドのcDNAのコーディング領域を、翻訳フレームが一致するように挿入することにより発現ベクターを構築する。ミニフィブロネクチンの両方の末端をコードするcDNAは、例えば、公知の方法により線維芽細胞から抽出したRNAを鋳型とし（Analytical Biochemistry, 162, 156-159, 1987）、逆転写酵素により1本鎖cDNAを作成

し、必要な領域を増幅して得られる。マルチクローニング部の導入は、これらのミニフィブロネクチンの両末端のcDNA鎖の間に公知の方法により、所望のcDNA鎖を連結することにより行える。同様に、異種蛋白質またはペプチドのcDNAも、目的のcDNAの供給源から抽出したRNAを鋳型として、逆転写して得られる。かかるcDNAの挿入は、自体公知の方法により、制限酵素を用いる切断、リガーゼを用いる連結により行うことができる。

【0009】かくして、構築された発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該細胞を増殖させ、本発明のキメラ蛋白質を細胞外マトリックス中に発現させる。宿主細胞としては、特に限定するものではなく、いずれの動物細胞も使用可能であり、その増殖は、使用する細胞に適した培養条件を適宜選択して行うことができる。

【0010】本発明のキメラ蛋白質は、挿入した異種蛋白質またはペプチドの生理活性を保持したまま細胞外マトリックス中に発現、不溶化されるので、異種蛋白質またはペプチドから由来する種々の生理活性細胞外マトリックスに賦与でき、個々の生理活性に応じて、医薬や医学等の分野における広範な利用が考えられる。例えば、上記のごとく、TIMPを挿入した場合は、そのMMP阻害作用によるがんの浸潤や転移抑制に利用可能性がある。また、プロテインAのIgG結合ドメインを挿入した場合は、がん細胞の抗体等への結合を強め、免疫学的ながん抑制が期待できる。さらには、発光蛋白質等を挿入することにより、発光等の追跡から細胞外マトリックスへの物質の取り込み、代謝の研究等にも有効に利用できる。

【0011】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例1

蛋白質またはペプチドを細胞外マトリックスへ不溶化するためのマトリックスターゲティングベクターの作成  
上記のごとく、本発明者らは、既にフィブロネクチンのアミノ末端側70kDa領域とカルボキシ末端側37kDaを直結した組換えミニフィブロネクチンが、細胞外マトリックスへの高い不溶化能を保持していることを報告した。しかし、該組換えミニフィブロネクチンは、フィブロネクチンをコードするcDNA上の適当な制限酵素部位を利用してつなぎ合わせた組換え遺伝子を利用しているため、本来のアミノ末端70kDa領域に含まれる9番目のI型モジュールを欠失しているほか、カルボキシ末端37kDa領域のアミノ末端側には14番目のIII型モジュールの一部が余分に付加されているなど、いくつかの改善すべき点を含んでいる。また、1番目のIII型モジュールが、フィブロネクチンの細胞外マトリックスへの不溶化に関与することが報告されてい

るが(The Journal of Cell Biology, 118, 421-429, 1992)、このモジュールは上記本発明者らの報告したミニフィブロネクチンには、含まれていない。これらの改良すべき点を考慮し、該ミニフィブロネクチン発現用ベクターを以下のように改変し、任意の蛋白質またはペプチドをミニフィブロネクチンとキメラ化して動物細胞の細胞外マトリックスに不溶化させるための新たな発現ベクターの調製を行った。

【0012】(1) フィブロネクチンの9番目のI型モジュールと1番目のIII型モジュールをコードするcDNA断片の調製

ヒト繊維芽細胞株WI-38 (Japanese Cancer Research Resources Bankカタログ番号CCL75)よりChomczynskiおよびSacchiの方法(上記Analytical Biochemistry, 162, 156-159, 1987)を用いてRNAを抽出し、これを鋳型として、常法に従って逆転写酵素と共役したポリメラーゼ連鎖反応法(polymerase chain reaction: 以下PCR法と略す)(Kawasaki, E. S., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M.A. 他編), Academic Press, Inc., pp. 21-27, 1990)を用いて、ヒトフィブロネクチンの7番目、8番目および9番目のI型モジュールと、それにづく1番目のIII型モジュールをコードする793塩基対のcDNAを以下の2種類のプライマー(プライマーNo. 1およびプライマーNo. 2)を用いて増幅した。なお、3'末端側逆方向プライマーは、NruI、NotIおよびMluIの3種類の制限酵素部位からなるマルチクローニング配列を5'末端側に付加したものをを用いた。

【0013】プライマーNo. 1 (5'末端側順方向プライマー)

5' G C C C C A T G G C T G C C C A C G A G G A A A T 3'

プライマーNo. 2 (3'末端側逆方向プライマー)

5' A C G C G T G C G G C C G C C T C G C G A A A G G G A G T C G T C T C T C C T G T C A C G 3'

【0014】(2) フィブロネクチンの14番目のIII型モジュールをコードするcDNA断片の調製

(1)と同様にして、ヒト繊維芽細胞株WI-38より調製したRNAを鋳型として、逆転写酵素と共役したPCR法を用いて、ヒトフィブロネクチンの14番目のIII型モジュールをコードする366塩基対のcDNAを以下の2種類のプライマー(プライマーNo. 3およびプライマーNo. 4)を用いて増幅した。なお、5'末端側逆方向プライマーは(1)の場合と同様、NruI、NotIおよびMluIの3種類の制限酵素部位からなるマルチクローニング配列を5'末端側に付加したものをを用いた。

【0015】プライマーNo. 3 (5'末端側順方向プライマー)

5' T C G C G A G G C G G C C G C A C G C G T T G C C A T T G A T G C A C C A T C C A A C C T 3'

プライマーNo. 4 (3'末端側逆方向プライマー)

5' G T G G A A G G A A C T T C C A A G A T C T C T 3'

【0016】(3) 9番目のI型モジュールおよび1番目と14番目のIII型モジュールを含む改良型ミニフィブロネクチン発現ベクターpMTX-1の作成  
上記の、発明者らが報告したミニフィブロネクチンの発現ベクターであるプラスミドpAISF70F2を、制限酵素NcoIおよびBglIIで消化し、7番目と8番目のI型モジュールおよび14番目のIII型モジュールの一部をコードする438塩基対のcDNA断片を除去したプラスミド断片をアガロースゲルを用いたゲル電気泳動により採取した。一方、(1)で調製した793塩基対のcDNAを制限酵素NcoIとNotIで消化し、生じた777塩基対のcDNA断片を同様にアガロースゲル電気泳動により分離した。また、同様にして、(2)で調製した366塩基対のcDNAをNotIとBglIIで消化し、334塩基対のcDNA断片を分離した。このようにして分離した777塩基対のNcoI/NotI cDNA断片と344塩基対のNotI/BglII cDNA断片を、NcoIおよびBglIIで消化して得たプラスミド断片に同時にライゲートし、所望の改良型ミニフィブロネクチン発現ベクターpMTX1を得た。この発現ベクターの構造を図2に示す。

【0017】実施例2

改良型ミニフィブロネクチン発現ベクターpMTX1を用いたミニフィブロネクチンとTIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) とのキメラタンパク質の細胞外マトリックスへの不溶化(ターゲティング)

(1) TIMPをコードするcDNAの調製

ヒト繊維肉腫細胞HT1080 (Japanese Cancer Research Resources Bankカタログ番号JCRB9114)より上記ChomczynskiおよびSacchiの方法によりRNAを抽出し、実施例1(1)と同様に逆転写酵素と共役したPCR法を用い、184アミノ酸残基からなる成熟型ヒトTIMP-1をコードするcDNAを以下の2種類のプライマー(プライマーNo. 5およびプライマーNo. 6)を用いて増幅した。なお、5'末端側順方向プライマーNo. 5および3'末端側逆方向プライマーNo. 6の5'末端には、それぞれ制限酵素NotIとMluIの認識塩基配列を付加したものをを用いた。

【0018】プライマーNo. 5 (5'末端側順方向プライマー)

5' T C G C G A G G C G G C C G C T G C A G C T G C T C C C C G G T G C A C C C G 3'

(アンダーラインは、付加したNotI認識塩基配列を

示す)

プライマーNo. 6 (3' 末端側逆方向プライマー)

5' CGACGCGTCTTGGGGGGCGCCGC  
GCCGCGGTA3'

(アンダーラインは、付加したMluI認識塩基配列を示す)

【0019】かくして増幅したヒトTIMP-1のcDNAは、制限酵素SmaIで開裂したcDNAクローニング用ベクターであるブルースクリプトIKS+ (ストラタジーン社) にサブクローニングした後、サンガー (Sanger) らのダイデオキシ法 (Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A., 74, 5463-5467, 1977) を用いて全塩基配列を決定し、配列が正しいことを確認した。

【0020】(2) TIMP-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質発現ベクターの調製

実施例1で作成した改良型ミニフィブロネクチン発現ベクターpMTX1を制限酵素NotIとMluIで消化した後、イー・コリ・アルカリホスファターゼ (宝酒造社製) を用いて5' 末端を脱リン酸化した。一方、実施例2-(1) で増幅したTIMP-1をコードするcDNAを同様に、制限酵素NotIとMluIで消化した後、得られた559塩基対のcDNA断片を同様にNotIとMluIで消化後、脱リン酸化したpMTX1にライゲートし、所望のTIMP-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質発現ベクターpMTX-TIMP-1を得た。

【0021】(3) TIMP-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質発現ベクターpMTX-TIMP-1のマウスL細胞への導入

5×10<sup>5</sup>個のマウスL細胞 (岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所石浦正寛博士より供与) を直径100mmの組織培養用ディッシュ (ファルコン社製) に播種し、10%のウシ胎児血清を含むダルベッコ改良イーグル培地 (以下DMEMと略す) を用いて5%炭酸ガス存在下35℃で18時間培養した。塩化セシウム密度勾配遠心法を2回繰り返して精製した18μgのプラスミドpMTX-TIMP-1と、同様にして精製したネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドpKOno

(コールドスプリングハーバー研究所 D. Hanahan博士より供与: Journal of Virology, 50, 606-614, 1984) 2μgをChenおよびOkayamaの方法 (Molecular and Cellular Biology, 7, 2745-2752, 1987) に従って、リン酸カルシウムの微粒子と共沈させ、得られたコロイド状溶液を上記のマウスL細胞の培地に加えて、3%炭酸ガス存在下、35℃で24時間培養し、pMTX-TIMP-1をL細胞内に導入した。培地を除き、ウシ胎児血清を含まないDMEMで2回細胞を洗った後、10%ウシ胎児血清を含むDMEMを加えて、5%炭酸ガス存在下さらに35℃で

24時間培養した。斯くして得たpMTX-TIMP-1導入L細胞を0.2%トリプシン/0.05%EDTA溶液 (ギブコ社製) を用いて浮遊させ、1:10に希釈した後、再度100mm培養用ディッシュに播種し、10%ウシ胎児血清を含むDMEMを用いてさらに35℃で24時間培養した。ついで、500μg/mlのネオマイシン (商品名G418、ギブコ・オリエンタル社製) を含む培地に交換してさらに2週間培養を続け、ネオマイシン耐性の細胞のクローンを24個単離した。各クローンの細胞を別々に24穴培養用ディッシュに移し、さらにネオマイシンを含む培地で7日間培養した後、各クローンごとに培地を200μl採取して、ニトロセルロース膜上にドットプロットした。該ニトロセルロース膜を1%ウシ血清アルブミンを含む生理食塩水でブロッキングした後、100倍希釈した抗ヒトTIMP単クローン抗体 (富士薬品工業製) と室温で1時間反応させ、結合した抗体をペルオキシターゼ標識した抗マウスIgG抗体 (カッペル社製) を用いて検出した結果、採取した24クローン中、4クローンで有意なTIMP-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質の発現が認められた。

【0022】(4) TIMP-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質の細胞外マトリックスへの不溶化

実施例2-(3) でTIMP-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質の発現が確認された4クローンの中で、最もキメラタンパク質の発現が高いクローン (L/r70F2a-TIMP-1) を24穴培養ディッシュ上で飽和密度に達するまで培養した後、細胞をウシ胎児血清を含まないDMEMで細胞が剥がれないように注意しながら2回洗浄し、10%のウシ胎児血清を含むDMEMでそれぞれ100倍に希釈した家兎抗ヒトフィブロネクチン抗血清、マウス抗ヒトフィブロネクチン特異的単クローン抗体 (宝酒造社製) およびマウス抗体ヒトTIMP単クローン抗体 (富士薬品工業製) と室温で1時間反応させた。反応後、細胞を再度ウシ胎児血清を含まないDMEMで3回洗浄し、つぎに10%ウシ胎児血清を含むDMEMで100倍に希釈した蛍光色素で標識したヤギ抗家兎IgG抗体あるいはヒツジ抗マウスIgG抗体と室温で30分反応させた。反応後、細胞を再び血清を含まないDMEMで3回洗浄し、倒立型蛍光顕微鏡 (オリンパスIMT-2) で観察した。なお、対照として、何も組換え遺伝子を導入していないL細胞を同様に間接蛍光抗体法で染色し、染色パターンを比較した。

【0023】その結果、マウスフィブロネクチンとヒトフィブロネクチンの両方と反応する家兎抗ヒトフィブロネクチン抗血清は、対照のL細胞とTIMP-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質を発現しているL細胞の両方の細胞外マトリックスを染色したが、ヒトフィブロネクチンに特異的な単クローン抗体は、キメラタンパク質を発現している細胞のマトリックスだけを選択的に染

色した。また、抗ヒトTIMP単クローン抗体も同様にキメラタンパク質を発現しているL細胞のマトリックスを特異的に染色した。これらの結果から、TIMP-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質は、細胞外マトリックスに組織化される活性を保持していることが確認された。

#### 【0024】実施例3

改良型ミニフィブロネクチン発現ベクターpMTX1を用いたミニフィブロネクチンとプロテインA IgG結合ドメインとのキメラタンパク質の細胞外マトリックスへの不溶化（ターゲティング）

（1）プロテインA IgG結合ドメイン（ドメインA）をコードするcDNAの調製  
スタフィロコッカスが産生するイムノグロブリン（IgG）結合タンパク質プロテインAは、アミノ酸約58残基からなる互いに構造の類似した5個のIgG結合ドメインを含んでいる。これら5個のIgG結合ドメインの中の1つ（ドメインA）をコードするcDNAをプロテインA発現ベクターpRIT2T（ファルマシア社製）のプラスミドDNAを鋳型として、下記の2種類のプライマー（プライマーNo. 7とプライマーNo. 8）を用いてPCR法により増幅した。なお、5'末端側順方向プライマーNo. 7および3'末端側逆方向プライマーNo. 8の5'末端には、それぞれ制限酵素Not IとMlu Iの認識塩基配列を付加したものをを用いた。

【0025】プライマーNo. 7（5'末端側順方向プライマー）

5' TCGCGAGGCGGCCGCTGATAA  
CAATTTCAACAAA3'

（アンダーラインは、付加したNot I認識塩基配列を示す）

プライマーNo. 8（3'末端側逆方向プライマー）

5' CGACGCGTTTTCGGTGCTTGAGATTCATT3'

（アンダーラインは、付加したMlu I認識塩基配列を示す）

【0026】かくして増幅したプロテインAドメインAは、制限酵素Sma Iで開裂したcDNAクローニング用ベクターであるブルースクリプトIKS+（ストラタジーン社）にサブクローニングした後、上記サンガー（Sanger）らのダイデオキシ法を用いて全塩基配列を決定し、配列が正しいことを確認した。

【0027】（2）プロテインA-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質発現ベクターの調製

実施例1で作成した改良型ミニフィブロネクチン発現ベクターpMTX1を制限酵素Not IとMlu Iで消化した後、イー・コリ・アルカリホスファターゼ（宝酒造社製）を用いて5'末端を脱リン酸化した。一方、実施例3-（1）で増幅したプロテインAドメインAをコードするcDNAを同様に制限酵素Not IとMlu Iで

消化した後、得られた181塩基対のcDNA断片を同様にNot IとMlu Iで消化後、脱リン酸化したpMTX1にライゲートし、所望のプロテインA-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質発現ベクターpMTX-PA1を得た。

【0028】（3）プロテインA-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質発現ベクターpMTX-PA1のマウスL細胞への導入

実施例2-（3）と同様にマウスL細胞を直径100mmの組織培養ディッシュに播種し、塩化セシウム密度勾配遠心法を2回繰り返して精製した18μgのプラスミドpMTX-PA1と2μgのネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドpK<sub>neo</sub>をChenおよびOkayamaの方法を用いて導入、強制発現させた。500μg/mlのネオマイシンを含む培地で2週間培養し、組換え遺伝子を強制発現している細胞を24クローン採取し、各クローンを24穴培養用ディッシュに移して飽和密度に達するまで培養した後、各クローンごとに培地を200μl採取して、ニトロセルロース膜上にドットブロットした。該ニトロセルロース膜を1%ウシ血清アルブミンを含む生理食塩水でブロッキングした後、100倍希釈したマウス抗ヒトフィブロネクチン単クローン抗体FN8-12（宝酒造社製）と室温で1時間反応させ、結合した抗体をペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG抗体（カッペル社製）を用いて検出した。採取した24クローン中、6クローンで有意なプロテインA-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質の発現が確認された。

【0029】（4）プロテインA-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質の細胞外マトリックスへの組織化  
実施例3-（3）でプロテインA-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質の発現が確認された6クローンの中で、最もキメラタンパク質の発現が高いクローン（L/r70F2a-PA1）を24穴培養ディッシュ上で飽和密度に達するまで培養した後、実施例2-（4）で記載のごとく、100倍に希釈したマウス抗ヒトフィブロネクチン特異的単クローン抗体FN8-12（宝酒造社製）を用いて間接蛍光抗体法により染色した。また1次抗体（この場合は抗ヒトフィブロネクチン特異的単クローン抗体）を使わずに蛍光色素で標識したヒツジ抗マウスIgG抗体で直接染色した場合についても同時に検討した。なお、対照として、何も組換え遺伝子を導入していないL細胞およびプロテインAとキメラ化していないミニフィブロネクチンだけを発現させたL細胞を同様に間接蛍光抗体法で染色し、染色パターンをプロテインA-ミニフィブロネクチンキメラタンパク質を発現させたL細胞と比較した。

【0030】1次抗体として抗ヒトフィブロネクチン特異的単クローン抗体を用いた間接蛍光抗体染色では、キメラ化していないミニフィブロネクチンを発現させたL細胞もプロテインAとのキメラタンパク質を発現させた

L細胞も、細胞外マトリックスの繊維構造がはっきりと染色され、プロテインAとのキメラタンパク質が細胞外マトリックスへ取り込まれることが示された。さらに、これらの細胞を1次抗体を使わずに、蛍光標識した2次抗体で直接染色すると、キメラ化していないミニフィブロネクチンを発現しているL細胞は全く蛍光染色されなかったが、プロテインAとのキメラタンパク質を発現しているL細胞はその細胞外マトリックスの繊維構造がはっきり繊維された。この結果から、ミニフィブロネクチンとのキメラ化したプロテインAのIgG結合ドメインは、細胞外マトリックスに組織化された状態でも本来の

IgG結合活性を保持していることが確認された。

【0031】

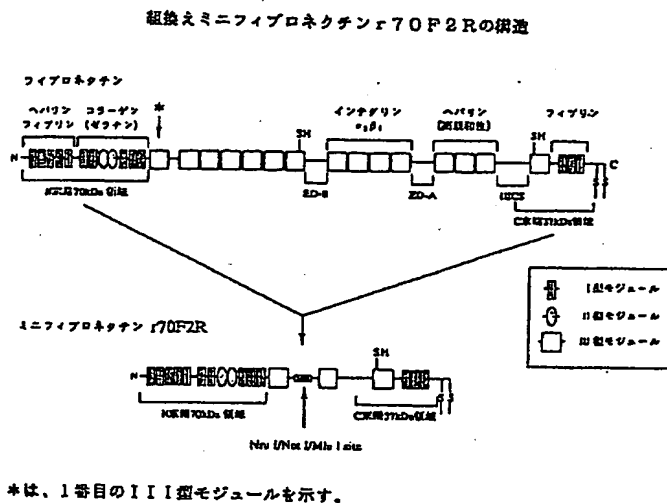
【発明の効果】本発明によれば、医薬等として、またそれらの研究、開発に有用な、任意の機能性蛋白質を細胞外マトリックス中に不溶化またはターゲティングできる新規キメラ蛋白質が提供できる。

【図面の簡単な説明】

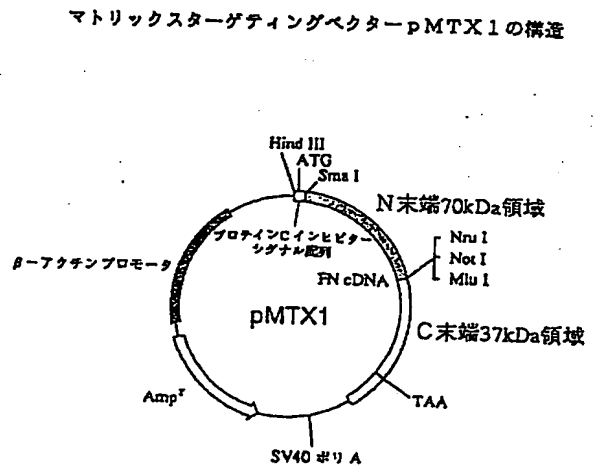
【図1】 組換えミニフィブロネクチンr70F2Rの構造

【図2】 マトリックスターゲティングベクターpMTX1の構造

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 1 2 P 21/02

// A 6 1 K 38/00

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 9282-4B

ADU